

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 21 日 (21.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/041319 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61L 27/42, 27/36, 27/56

[JP/JP]; 〒174-8639 東京都板橋区前野町2丁目3番9号ペンタックス株式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014174

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 7 日 (07.11.2003)

(74) 代理人: 朝比一夫, 外(ASAHI,Kazuo et al.); 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目18番9号西新橋ノアビル4階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-324371 2002 年 11 月 7 日 (07.11.2002) JP
特願2002-356079 2002 年 12 月 6 日 (06.12.2002) JP

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): ペンタックス株式会社 (PENTAX CORPORATION) [JP/JP]; 〒174-8639 東京都板橋区前野町2丁目3番9号 Tokyo (JP).

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 小野 一郎 (ONO, Ichiro) [JP/JP]; 〒005-0013 北海道札幌市南区真駒内緑町3丁目4-2-406 Hokkaido (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中須 正議 (NAKASU, Masanori) [JP/JP]; 〒174-8639 東京都板橋区前野町2丁目3番9号ペンタックス株式会社内 Tokyo (JP). 松本 智勇 (MATSUMOTO, Toshio)

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: THERAPEUTIC DEVICE FOR OSTEOGENESIS

(54) 発明の名称: 骨形成治療デバイス

(57) Abstract: It is intended to provide a therapeutic device for osteogenesis which has an excellent osteogenesis ability and enables the formation of a bone suitable for the shape of a transplantation site. Namely, a therapeutic device for osteogenesis, which contains a nucleic acid having a base sequence encoding a bone morphogenetic protein (BMP), an angiogenesis inducer and a substrate, to be transplanted into a living body to perform osteogenetic therapy.

(57) 要約:

本発明は、優れた骨形成能を有し、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバイスを提供することを課題とする。本発明の骨形成治療デバイスは、骨形態形成タンパク質 (BMP) をコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、基体とを含むものであり、生体内に移植して骨形成治療を行うものである。

明 細 書

骨形成治療デバイス

技術分野

本発明は、骨形成治療デバイスに関するものである。

背景技術

医療の分野では、いわゆる人工骨、人工皮膚、人工臓器に対する研究が注目を集めており、これらについて、既に臨床の現場でも種々の立場から新たな挑戦が行われており、ここ数年技術的にも多大な伸展を示している。

特に、同種移植に関しては、需要が供給を大きく上回る状態が慢性的に持続していることに加え、未知の感染症などの問題もある。

これらを回避するため、このような同種組織の移植に代わるものとして、人工的に製造した人工組織・人工臓器の開発が待望されている。この点に関しては、骨移植においても同様である。

骨の形成過程、修復過程について、多くの研究者によって解明され、その制御の要となる骨誘導因子の発見・同定・分離に加え、遺伝子工学的手法での骨誘導因子の生成が可能となり、その作用機序についての知見も集積されている。

この骨誘導因子としては、Transforming Growth Factor b (TGFb) の super family に属する骨形態形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein: BMP) が多くの研究者の注目を集めている。このBMPは、皮下組織または筋組織内の未分化間葉系細胞に作用して、これを骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化させ、骨または軟骨を形成させる活性タンパク質であり、その基礎的検討が開始されている。

例えば、特表2001-505097号公報には、BMP自体またはBMPをコードするDNAを、マトリックス材料(基体)に担持(適用)した移植体材料が開示されている。

しかしながら、BMPはタンパク質であることから失活し易いという問題があり、

大量を用いることが必要なことが明らかになっている。一方、BMPをコードするDNAを単独で用いても、十分な骨形成が効率よくなされないという問題がある。BMPをコードするDNAを単独で用いた場合に骨形成が効率よくなされない理由は、例えば、次のようなものであると推察される。すなわち、BMPをコードするDNAを用いることにより、良好にBMPが産生され、未分化間葉系細胞の骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化が促進されたとしても、これらの分化した細胞が効率よく増殖できない結果、骨形成が促進されないのではないかということである。

また、このマトリックス材料は、通常、移植体材料を移植する骨欠損部等の移植部位の形状に対応して形成される。そして、移植部位では、マトリックス材料が骨形成の場となる。

ここで、骨形成治療を早期に達成する観点からは、マトリックス材料の内部に優先的に骨形成が進行することが好ましい。

しかしながら、従来の移植体材料では、マトリックス材料の内部に優先的に骨形成が進行するものとは言い難く、その内部形状（空孔形態）等によっては、マトリックス材料の外表面に優先的に骨形成が進行する場合がある。この場合、移植部位の形状から大きく逸脱して骨形成がなされることになり好ましくない。

発明の開示

本発明は、以上のような問題点に鑑みなされたもので、その主たる目的は、優れた骨形成能を有する骨形成治療デバイスを提供することにある。

また、本発明の他の目的は、優れた骨形成能を有し、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバイスを提供することにある。

上記目的を達成するために、本発明に係る骨形成治療デバイスは、

骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列および発現プラスミド由来の塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、前記核酸を保持する非ウィルス由来のベクターと、生体適合性を有する基体と、を含み、

前記血管形成誘導因子と前記核酸とを、重量比で10：1～1：100で配合したことを特徴とする。

以上の本発明によれば、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列

および発現プラスミド由来の塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子とを含むことにより、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞や軟骨芽細胞（以下、「骨芽細胞」で代表する。）の周囲に、骨芽細胞に分化すると同時期または先行して（早期に）、細胞の構築に必要な各種基質を供給する血管が形成される。このため、この血管を介して骨芽細胞に、その増殖に必要な各種基質が効率よく供給され、これにより、骨芽細胞の増殖が促進される。また、血管形成誘導因子自体が、直接、骨芽細胞に作用し、その増殖を促進させる効果も期待できる。

特に、血管形成誘導因子と核酸とを、重量比で10：1～1：100で配合したことにより、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化に先立って、血管が形成されるようになり、その結果、上記効果がより顕著に発揮される。

また、核酸を保持する非ウイルス由来のベクターを含むことにより、骨形成に関与する細胞（未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞等）への核酸の取り込みの効率を調整して、未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化に対して、血管の形成を優先させることができ、その結果、骨芽細胞をさらに効率よく増殖させることができる。

かかる効果は、ウイルス由来のベクターより、細胞への核酸の導入率が低い非ウイルス由来のベクターを用いることにより好適に発揮される。すなわち、ウイルス由来のベクターを用いた場合、骨形成に関与する細胞に核酸をすばやく取り込ませることができ、これにより、骨形成に関与する細胞は、BMPを発現して未分化間葉系細胞から骨芽細胞への早期の分化を達成し得るが、この時点で、血管の形成が追いつかず、その後の骨芽細胞の効率のよい増殖が期待できない。

本発明において、好ましくは、前記基体は、隣接する空孔同士が連通する連続空孔を有する多孔質ブロック体で構成される。これにより、優れた骨形成能を有し、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバイスを提供することができる。

この場合、前記基体の隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）をA [μm^2] とし、前記空孔の最大断面積（平均）をB [μm^2] としたとき、 B/A が2～150なる関係を満足することが好ましい。これにより、基体内部での骨形成を促し、基体の形状、すなわち、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバ

イスを提供することができる。

また、好ましくは、前記空孔の最大断面積（平均） B は、 $7.9 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ である。これにより、効果的な骨伝導性を得ることができる。すなわち、骨欠損部に埋入された基体の空孔内に連続的な骨形成が可能になる。

また、本発明では、前記基体の空孔率は、 $30 \sim 95\%$ であることが好ましい。これにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞の基体内への侵入がさらに容易となり、基体をより好適な骨形成の場とすることができる。

また、本発明では、前記血管形成誘導因子は、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）のうちの少なくとも1種であることが好ましい。これらのものは、血管形成能に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に、高い骨形成能を有するものとなる。

また、本発明では、前記骨形態形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種であることが好ましい。これは、BMP-2、BMP-4、BMP-7は、特に、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導する作用に優れているからである。

また、本発明では、前記核酸を、前記基体の体積1mLあたり $1 \sim 100 \mu\text{g}$ となるよう用いることが好ましい。これにより、より迅速な骨形成を促すことができる。

また、本発明では、前記非ウィルス由来のベクターは、リポソームであることが好ましい。リポソームは、細胞膜の構成成分に近い成分で構成されるため、細胞膜への結合（融合）が比較的容易かつ円滑になされ、核酸の未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞への取り込みの効率をより向上させることができる。

この場合、前記リポソームは、正荷電リポソームであることが好ましい。正荷電リポソームは、その内部に核酸を封入する操作を必要としないことから、骨形成治療デバイスの作製時間の短縮に有利である。

また、本発明では、前記非ウィルス由来のベクターと前記核酸との配合比は、重量比で $1 : 1 \sim 20 : 1$ であることが好ましい。これにより、コストの増大や細胞

毒性の発生を防止しつつ、核酸の未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞への取り込みの効率を十分に大きくすることができる。

以上述べたように、本発明では、前記基体は、ブロック体であることが好ましく、また前記基体は、多孔質体であることが好ましい。これにより、骨形成治療デバイスが早期に移植部位から散逸するのを防止することができるとともに、骨形成をブロック体の形状に沿って進行させることができる。また、核酸および血管形成誘導因子を、より容易かつ確実に基体に担持させることができるとともに、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞が基体内に侵入し易くなり、骨形成にとって有利である。

この場合、前記多孔質体の空孔率は、30～95%であることが好ましい。これにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞の基体内への侵入がさらに容易となり、基体をより好適な骨形成の場とすることができる。

また、本発明では、前記基体は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主としてなるものであることが好ましい。ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様の構造であるため、特に優れた生体適合性を有している。

本発明の他の目的、構成および効果は、図面を参照して行う以下の好適実施形態の説明からより明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、組換えプラスミドの一例を示す遺伝子地図である。

図2は、本発明における基体の縦断面を示す模式図である。

図3は、参考例の基体の縦断面を示す模式図である。

図4は、実施例1のハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真である。

図5は、実施例2のハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の骨形成治療デバイスについて第1および第2の実施形態に基づいて詳細に説明する。

本発明の骨形成治療デバイスは、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、基体とを含むものであり、生体内に移植して骨形成治療を行うものである。

本発明者は、上記問題点に鑑み、鋭意検討を重ねた結果、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞や軟骨芽細胞を効率よく増殖させるためには、細胞の構築（形成）に必要な各種基質を供給する経路を確保すること、すなわち、骨芽細胞や軟骨芽細胞を誘導、増殖させる血管を、これらの周囲へ早期に形成させることが重要であるとの考えに至り、本発明を完成するに至った。

本発明によれば、BMPをコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子との併用による相乗効果により、未分化間葉系細胞の骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化を促進するとともに、これらの分化した細胞を効率よく増殖させ、その結果、骨形成を促進することができる。

また、これらの分化した細胞（幹細胞）に、血管形成誘導因子自体が直接作用し、増殖させる効果も期待できる。

ここで、本明細書中における「骨形成」とは、骨形成および軟骨形成の双方を含み、未分化間葉系細胞に対して骨芽細胞や軟骨芽細胞（以下、骨芽細胞で代表する）の分化を誘導することによる骨形成や軟骨形成のことを言う。

また、「骨形成治療」とは、医科領域および歯科領域において、骨組織や軟骨組織の形成や補填を要する疾患の予防や治療を行うこと、あるいは、症状を改善させることを言う。

以下、本発明の骨形成治療デバイスの第1の実施形態について詳細に説明する。

なお、以下の説明では、骨誘導因子として、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸を代表に説明する。骨誘導因子として、BMPをコードする塩基配列を含む核酸を用いることにより、より迅速な骨形成を促すことができる。

また、BMPをコードする塩基配列としては、通常、cDNAが用いられるため、

以下では、BMPをコードする塩基配列を、「BMP cDNA」と言う。

本発明におけるBMPとしては、未分化間葉系細胞に対して骨芽細胞への分化を誘導することにより骨形成を促す活性を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-12（以上、ホモダイマー）、もしくは、これらのBMPのヘテロダイマーまたは改変体（すなわち、天然に存在するBMPのアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、天然に存在するBMPと同じ活性を有するタンパク質）等が挙げられる。これらの中でも、BMPとしては、特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種が好ましい。BMP-2、BMP-4、BMP-7は、特に、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導する作用に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に高い骨形成能を示す。

このようなことから、本発明で用いるBMP cDNAとしては、前述のような各種BMPを産生（発現）し得る塩基配列を含むものであればよい。すなわち、BMP cDNAとしては、天然に存在するBMPをコードする塩基配列と同一、または、天然に存在するBMPをコードする塩基配列において1以上の塩基が欠失、置換および／または付加されたものを用いることができる。また、これらのものは、1種または2種以上を組み合わせる用いるようにしてもよい。

このようなBMP cDNAは、例えば、特表平2-500241号公報、特表平3-503649号公報、特表平3-505098号公報等に記載の方法に従って、入手することができる。

また、このような核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含むもの、すなわち、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだ（導入した）ものであるのが好ましい。

以下では、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだものを、「組換えプラスミド」と言い、この組換えプラスミドを、BMP cDNAをコードする塩基配列を含む核酸の代表として説明する。

このような組換えプラスミドを用いることにより、これを取り込んだ未分化間葉

系細胞、炎症細胞、線維芽細胞等（以下、これらを総称して、「骨形成に関与する細胞」と言う。）内におけるBMPの発現効率を、極めて高くすることができる。

発現プラスミドには、遺伝子組工学技術の分野で広く用いられるものの中から選択することができ、例えば、pCAH、pSC101、pBR322、pUC18等の1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。

また、この組換えプラスミドには、適宜、BMPの発現を適切に制御する塩基配列（DNA断片）を導入することができる。

発現プラスミドに、BMP cDNAを含む各種の塩基配列を組み込む方法には、公知の方法を用いることができる。

ここで、図1に、組換えプラスミド（キメラDNA）の一例を示す。

図1に示す組換えプラスミドは、BMP-2 cDNAを、発現プラスミドであるpCAHに導入したものである。

この組換えプラスミドは、Amp（アンピシリン）に耐性を示すDNA断片を含むとともに、サイトメガロウィルス（CMV）由来のエンハンサー・プロモーターを含むDNA断片と、BMP-2 cDNAの下流域には、SV40由来の転写終結信号を含むDNA断片とが組み込まれている。

用いる組換えプラスミド（核酸）の量は、特に限定されないが、後述する基体の体積1mLあたり1～100 μ g程度であるのが好ましく、10～70 μ g程度であるのがより好ましい。用いる組換えプラスミドの量が少な過ぎると、迅速な骨形成を促すことができない場合がある。一方、用いる組換えプラスミドの量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めない。

本発明における血管形成誘導因子としては、血管形成を促進し得るものであればよく、特に限定されないが、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic Fibroblast Growth Factor：bFGF）、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor：VEGF）、肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor：HGF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor：GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（Granulocyte-Colony Stimulating Factor：G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（Macrophage-Colony Stimulating Factor：M-CSF）、幹細胞因子（Stem Cell Factor：

SCF)、アンジオポエチン-1 (Angiopoietin-1)、アンジオポエチン-2 (Angiopoietin-2)、リボヌクレアーゼ類似タンパク質、ニコチンアミド、プロスタグランジンE (プロスタグランジンE₁、プロスタグランジンE₂、プロスタグランジンE₃)、プロリン誘導体、ディブチルサイクリックAMP (dBcAMP) のようなサイクリックAMP誘導体等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。これらの中でも、血管形成誘導因子としては、特に、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) のうちの少なくとも1種であるのが好ましい。これらのものは、血管形成能に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に、高い骨形成能を有するものとなる。

用いる血管形成誘導因子の量は、その種類等により適宜設定され、特に限定されないが、血管形成誘導因子と組換えプラスミド (核酸) との配合比が、重量比で10 : 1 ~ 1 : 100程度であるのが好ましく、1 : 1 ~ 1 : 100程度であるのがより好ましい。用いる血管形成誘導因子の量が少な過ぎると、血管形成誘導因子の種類等によっては、新生血管が効率よく形成されず、骨芽細胞が十分に増殖できない場合がある。一方、用いる血管形成誘導因子の量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めない。

また、本発明の骨形成治療デバイスは、生体適合性を有する基体を有している。この基体は、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞による骨形成の場 (フィールド) となる。

基体の形態は、ブロック体 (塊状物) が好適である。ブロック体 (例えば焼結体等) は、形状安定性を有しており、生体に骨形成治療デバイスを移植した際に、骨形成治療デバイスが早期に移植部位から散逸するのを防止することができるのと同時に、骨形成をブロック体の形状に沿って進行させることができるので、特に、移植部位が比較的大きな骨欠損部等である場合に有効である。

なお、基体の形態は、骨形成治療デバイスの適用部位 (移植部位) に応じて、適宜選択するようにすればよく、例えば、粉末状、顆粒状、ペレット状 (小塊状) 等であってもよい。このような形態の基体を用いる場合には、組換えプラスミド (核酸) および血管形成誘導因子と混合した組成物を、骨形成治療デバイスとすること

ができ、かかる骨形成治療デバイスを、骨欠損部に充填する（詰め込む）ようにして用いることができる。

また、基体は、多孔質なもの（多孔質体）であるのが好ましい。基体として多孔質体を用いることにより、組換えプラスミド（核酸）および血管形成誘導因子を、より容易かつ確実に基体に担持させることができるとともに、骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞（例えば、血管内皮細胞等）が基体内に侵入し易くなり、骨形成にとって有利である。

この場合、その空孔率は、特に限定されないが、30～95%程度であるのが好ましく、55～90%程度であるのがより好ましい。空孔率を前記範囲とすることにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞の基体内への侵入がさらに容易となり、基体をより好適な骨形成の場とすることができる。この空孔率の測定方法としては、SEM（Scanning Electron Microscope）の画像に基づいて測定する方法や細孔分布測定装置による測定などが挙げられる。

また、基体の構成材料としては、生体適合性を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト、リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウムのようなリン酸カルシウム系化合物、アルミナ、チタニア、ジルコニア、イットリア等のセラミックス材料、チタンまたはチタン合金、ステンレス鋼、Co-Cr系合金、Ni-Ti系合金等の各種金属材料等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。

これらの中でも、基体の構成材料としては、リン酸カルシウム系化合物、アルミナ、ジルコニア等のセラミックス材料（いわゆる、バイオセラミックス）が好ましく、特に、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主材料とするものが好ましい。

ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様の構造であるため、特に優れた生体適合性を有している。また、正負両荷電を有しているため、特に、ベクターとしてリボソームを用いる場合（この点については、後に詳述する）には、このリボソームを基体に長時間、安定的に担持させることができ

る。その結果、リポソームに吸着または封入された組換えプラスミド（核酸）も基体に長時間、安定的に保持されることになり、より迅速な骨形成に寄与する。また、骨芽細胞との親和性も高いことから新生骨を維持する上でも好ましい。

このような基体は、種々の方法により作製（製造）することができる。基体として、セラミックス材料で構成される多孔質ブロック体を作製する場合を一例に説明すると、このような多孔質ブロック体は、例えば、セラミックス材料の粉体を含むスラリーを、骨欠損部等の移植部位に対応した形状に、例えば圧縮成形等により成形した成形体を得、かかる成形体を焼結（焼成）することによって作製することができる。また、セラミックス材料粉体と水溶性の高分子の水溶液とを混合攪拌して型へ流し込み、乾燥して成型体を得、かかる成型体を所望形状に加工後、焼結することによっても作製することができる。

以上のような骨形成治療デバイスは、組換えプラスミド（核酸）および血管形成誘導因子を基体に接触させることにより作製（製造）することができる。具体的には、骨形成治療デバイスは、例えば、組換えプラスミドおよび血管形成誘導因子のいずれか一方を含む液体（溶液または懸濁液）をそれぞれ、または、組換えプラスミドおよび血管形成誘導因子の双方を含む液体を基体に供給すること、あるいは、これらの液体に基体を浸漬すること等により、容易に作製することができる。

なお、基体として、粉末状、顆粒状、ペレット状等のものを用いる場合には、例えば、基体とバインダーと前述したような液体とを混練した混練物を、成形することにより骨形成治療デバイスを作製することもできる。

このような骨形成治療デバイスを、例えば骨欠損部等の移植部位に埋設（適用）すると、この骨形成治療デバイスの近傍に存在する骨形成に関与する細胞が、その細胞内に組換えプラスミド（核酸）を取り込む。これらの細胞内では、組換えプラスミドを鋳型として順次BMPが産生され、このBMPにより、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化が誘導される。また、このとき、血管形成誘導因子の作用により、基体の内部（すなわち、骨芽細胞の周囲）に新生血管が活発に形成されており、この血管を介して骨芽細胞の増殖に必要な各種基質が供給される。これにより、骨芽細胞が効率よく増殖し、その結果、骨形成が進行する。

さらに、このような骨形成治療デバイスは、ベクターを含むものが好ましい。こ

のベクターは、組換えプラスミド（核酸）を保持し、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みを促進する機能を有するものである。ベクターを用いることにより、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みの効率がより向上し、結果として、より迅速な骨形成が促される。

ベクターとしては、ウィルス由来でないベクター（すなわち、非ウィルス由来のベクター）、アデノウィルスベクター、レトロウィルスベクターのようなウィルス由来のベクターのいずれを用いてもよいが、非ウィルス由来のベクターを用いるのが好ましい。非ウィルス由来のベクターを用いることにより、限局した部位に比較的大量の組換えプラスミドを、容易かつ確実に供給することができ、また、感染を起こさないことから患者のより高い安全性を確保することができるという利点もある。さらに、非ウィルス由来のベクターを用いる方法は、ウィルスベクターや細胞を用いる *ex vivo* 等の方法では、ウィルスベクターや細胞への核酸の導入操作、核酸を導入したウィルスベクターや細胞を増殖させる操作等が必要であるのに対し、これらの操作を必要としないことから、時間と手間とを低減できるという点においても優れている。

非ウィルス由来のベクターとしては、種々のものを用いることができるが、リポソーム（脂質膜）を用いるのが好適である。リポソームは、細胞膜の構成成分に近い成分で構成されるため、細胞膜への結合（融合）が比較的容易かつ円滑になされる。このため、組換えプラスミドの骨形成に関与する細胞への取り込みの効率をより向上させることができる。

リポソームとしては、例えば、表面に組換えプラスミドを吸着する形態の正荷電リポソーム、内部に組換えプラスミドを封入する形態の負荷電リポソーム等を用いることができる。これらのリポソームは、単独または組み合わせて用いることもできる。

正荷電リポソームは、例えば、DOSPA (2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate) のようなポリカチオン性脂質を主としてなるものである。なお、正荷電リポソームとしては、例えば、QIAGEN社製の「SuperFect」等の市販品を用いることができる。

一方、負荷電リポソームは、例えば、3-*s n*-ホスファチジルコリン、3-*s n*-ホスファチジルセリン、3-*s n*-ホスファチジルエタノールアミン、3-*s n*-ホスファチダルエタノールアミン、または、これらの誘導体のようなリン脂質を主としてなるものである。

また、これらのリポソームには、例えばコレステロール等の脂質膜を安定化する添加剤を添加するようにしてもよい。

なお、リポソームとしては、特に、正荷電リポソームを用いるのが好ましい。正荷電リポソームは、その内部に組換えプラスミドを封入する操作を必要としないことから、骨形成治療デバイスの作製時間の短縮に有利である。

用いるベクターの量は、その種類等により適宜設定され、特に限定されないが、ベクターと組換えプラスミド（核酸）との配合比が、重量比で1：1～20：1程度であるのが好ましく、2：1～10：1程度であるのがより好ましい。用いるベクターの量が少な過ぎると、ベクターの種類等によっては、組換えプラスミドの骨形成に参与する細胞への取り込みの効率を十分に大きくすることができない場合がある。一方、用いるベクターの量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めないばかりでなく、細胞毒性が生じる場合がある。また、コストの増大を招き好ましくない。

以上、本発明の骨形成治療デバイスの第1の好適な実施形態について説明したが、本発明は、これに限定されるものではない。

前記実施形態では、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸として、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだ組換えプラスミドを代表に説明したが、本発明におけるBMPをコードする塩基配列を含む核酸としては、例えば、BMP cDNA（発現プラスミドに組み込まないもの）、BMPのmRNA、あるいは、これらに任意の塩基を付加したもの等であってもよい。

実施例

次に、本発明の第1の実施形態の具体的実施例について説明する。

（実施例1A）

1. 組換えプラスミドの調製

公知の方法により、ヒトBMP-2 cDNA（ヒトBMP-2をコードする塩

基配列)と、所望の塩基配列とを、発現プラスミドに組み込んで、図1に示すような組換えプラスミドを得た。

そして、この組換えプラスミドを、次のようにして増殖させた。

まず、室温で、組換えプラスミドを、DH5 α (Competent Bacteria) の懸濁液200 μ Lに添加した。

次に、この混合液をLB寒天培地に添加して、37 $^{\circ}$ C \times 12時間、培養した。

次に、この培養終了後、LB寒天培地に増殖したコロニーの中から比較的大きいコロニーを選択し、これをAmp (アンピシリン) を含むLB寒天培地に移植し、さらに37 $^{\circ}$ C \times 12時間、培養した。

その後、Ampを含むLB寒天培地で増殖したDH5 α の細胞膜を破壊し、その溶液から、組換えプラスミドを精製分離した。

2. ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) の製造

公知の湿式合成法によりハイドロキシアパタイトを合成し、ハイドロキシアパタイトスラリーを得た。

このハイドロキシアパタイトスラリーを噴霧乾燥して平均粒径15 μ m程度の粉体を得た。その後、この粉体を700 $^{\circ}$ C \times 2時間、仮焼成した後、汎用粉碎装置を使用し、平均粒径12 μ m程度に粉碎した。粉碎したハイドロキシアパタイト粉体と水溶性高分子とを含む混合液を発泡させるために攪拌し、ペースト状とした。なお、ハイドロキシアパタイト粉体と水溶性高分子の水溶液とは、重量比5:6で混合した。

このペースト状混練物を型に入れて、水溶性高分子をゲル化させるため80 $^{\circ}$ Cで乾燥し、成型体を製造した。成型体を汎用旋盤等の加工機械を使用し直径10mm \times 厚さ3mm (体積: 約0.24mL) の円盤状に加工した。

この円盤状成型体を1200 $^{\circ}$ C、大気中で2時間焼成し、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体を得た。

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体は、空孔率70%であった。この測定は、アルキメデス法により行った。

3. 骨形成治療デバイスの作製

組換えプラスミドを含有するリン酸緩衝液と、血管形成誘導因子である塩基性線

維芽細胞増殖因子 (b F G F) を含有するリン酸緩衝液と、ベクターである正荷電リポソーム (Q I A G E N 社製、「S u p e r F e c t」) を含有するリン酸緩衝液とを用意し、組換えプラスミドが $10 \mu\text{g}$ 、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F) $1 \mu\text{g}$ 、正荷電リポソームが $40 \mu\text{g}$ となるように、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に含浸させた。

これにより、骨形成治療デバイスを得た。

(比較例 1 A)

塩基性線維芽細胞増殖因子を用いない以外は、前記実施例 1 A と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

(比較例 2 A)

組換えプラスミドおよび正荷電リポソームを用いない以外は、前記実施例 1 A と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

(比較例 3 A)

組換えプラスミドおよび塩基性線維芽細胞増殖因子を用いない以外は、前記実施例 1 A と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

<評価>

1. 評価実験

72羽の家兎 (平均体重 3.0 kg) を用意した。各家兎には、それぞれ、次のような手術を施した。

まず、家兎に対して、 25 mg/kg ペントバルビタールナトリウム (アボットラボラトリー社製、「ネンブタール」) を静脈内投与することにより麻酔した。

次に、家兎の頭皮に切開を入れ、尾側を茎とする幅 2.5 cm × 長さ 3.0 cm の皮弁として挙上した。

次に、露出した骨膜に $2 \sim 3 \text{ mm}$ の切開を入れ、かかる部分に骨膜剥離子を当てて、直径約 3 mm の部分を剥離して頭蓋骨を露出させた。

次に、露出した頭蓋骨の正中付近を、頭蓋骨穿頭器を用いて開頭し、硬膜は温存するように、その直上まで頭蓋骨を除去した後、完全に止血した。なお、頭蓋骨の厚さは約 3 mm であり、開頭部分の直径は約 1.2 cm とした。

次に、開頭を行った家兎を18羽ずつの計4群に分け、第1群の各家兎には、そ

れぞれ、実施例の骨形成治療デバイスを、第2群の各家兎には、それぞれ、比較例1の骨形成治療デバイスを、第3群の各家兎には、それぞれ、比較例2の骨形成治療デバイスを、また、第4群の各家兎には、それぞれ、比較例3の骨形成治療デバイスを移植した後、皮弁を元の位置へ戻して縫合した。

そして、手術が行われた各家兎を、それぞれ、個別のケージに入れて飼育した。

2. 評価結果

手術後3、6、9週目に、それぞれ、各群の家兎を6羽ずつ、前記同様の麻酔薬を過量投与することにより屠殺した。

その後、頭蓋骨を直上の皮膚とともに一塊として切除し、採取した組織を直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固定した後、ポリエステル樹脂に埋入した。次に、このポリエステル樹脂に埋入した組織を、厚さ50 μ mとなるように薄切研磨した後、cole-HE染色を行った。これにより、組織標本を得た。

得られた各組織標本について、それぞれ、次のようにして骨形成率を測定した。すなわち、各組織標本を、それぞれ、デジタルカメラ(DP-12)付き実体顕微鏡システムSZX-12(オリンパス社製)で撮影した。次に、photoshop_ver4.0(アドビ社製)を使用し、撮影した画像データから新生骨部分をデジタル処理により抽出し、さらにSCIONイメージ(Scion社製)を用いて、画像解析の手法により前記抽出された新生骨部分の面積を計測数値化して骨形成率を求めた。

なお、骨形成率の測定は、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の面方向(厚さ方向に垂直な方向)の端部から5mm×ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の厚さ3mmの範囲について行った。

この結果を表1に示す。

表 1

	骨形成治療デバイス	評価結果		
		骨形成率 (%)		
		3週間後	6週間後	9週間後
実施例	組換えプラスミド 塩基性線維芽細胞増殖因子 正荷電リポソーム HAp多孔質焼結体	5.3±2.2	18.0±9.7	42.0±10.5
比較例 1	組換えプラスミド 正荷電リポソーム HAp多孔質焼結体	14.1±7.5	18.5±4.9	29.2±10.1
比較例 2	塩基性線維芽細胞増殖因子 HAp多孔質焼結体	3.2±3.2	19.5±1.4	31.0±9.6
比較例 3	正荷電リポソーム HAp多孔質焼結体	7.7±3.4	9.0±8.0	12.7±7.6

HAp: ハイドロキシアパタイト

表 1 に示すように、実施例の骨形成治療デバイス（本発明の骨形成治療デバイ

ス)の骨形成率は、比較例1～比較例3の骨形成治療デバイスの骨形成率と比較して、3週間後および6週間後では同等もしくは低いものもあったが、9週間後には、いずれのものよりも顕著に高くなった。

このように、組換えプラスミドと塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)とを併用することにより、極めて優れた骨形成能を有する骨形成治療デバイスが得られることが明らかとなった。

また、基体として、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に代わり、リン酸三カルシウム多孔質焼結体を用いて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記とほぼ同様の評価結果が得られた。

また、BMPをコードする塩基配列として、ヒトBMP-2をコードする塩基配列に代わり、ヒトBMP-1、ヒトBMP-2、ヒトBMP-3、ヒトBMP-4、ヒトBMP-5、ヒトBMP-6、ヒトBMP-7、ヒトBMP-8、ヒトBMP-9またはヒトBMP-12をコードする塩基配列、あるいは、これらを任意に組み合わせる骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

また、血管形成誘導因子として、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に代わり、血管内皮増殖因子(VEGF)または肝細胞増殖因子(HGF)、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

以上述べたように、本発明の1の実施形態によれば、極めて迅速な骨形成を可能とし、早期の骨形成治療に貢献することができる。

特に、本発明では、血管形成誘導因子を併用することにより、骨芽細胞の周囲に新生血管が活発に形成され、骨芽細胞が効率よく増殖して、その結果、迅速な骨形成がなされる。

このため、各種骨形成治療に際し、遊離骨移植を行う必要がなくなり、採骨部が不要となることから、より安全かつ確実で、合理的な手術が可能となる。

このようなことから、手術時間や入院期間の短縮を図ることができ、トータルの医療コストの削減、治療クオリティーの向上、患者のQOLの向上を図ることができる。

また、核酸を保持するベクターを併用することにより、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞内への核酸の取り込みの効率が向上して、結果として、より迅速な骨形成がなされ、前記効果がより向上する。

また、基体としてブロック体を用いることにより、基体の形状に沿って骨形成が良好に進行するので、移植部位が比較的大きな骨欠損部等である場合に有効である。

また、基体として、遺伝子治療に特化した多孔質体を用いることにより、核酸および血管形成誘導因子を、より容易かつ確実に基体に担持させることができるとともに、各種の骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞が基体内に侵入し易くなり、骨形成にとって有利である。

また、本発明の骨形成治療デバイスは、保存、取扱いや手術時の加工等が容易である。

次に、本発明の第2の実施形態について説明する。

また、本発明の骨形成治療デバイスは、多孔質ブロック体（例えば、焼結体）で構成された基体を有している。この基体は、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞による骨形成の場（フィールド）となる。

この多孔質ブロック体は、隣接する空孔同士が閉鎖された閉鎖空孔ではなく、互いに連通する連続空孔を有するものである。

図2は、本発明の第2の実施形態における基体の縦断面を示す模式図であり、図3は、参考例の基体の縦断面を示す模式図である。図2および図3中の符号「2」は、新生骨を示す。

本発明の第2の実施形態の骨形成治療デバイスは、基体1の隣接する空孔1a同士の境界部の面積（平均）を、空孔の最大断面積（平均）に対して適度な大きさに設定したことに特徴を有している。具体的には、図2に示すように、基体1の隣接する空孔1a同士の境界部の面積（平均）を $A [\mu\text{m}^2]$ とし、前記空孔の最大断面積（平均）を $B [\mu\text{m}^2]$ としたとき、 B/A が $2 \sim 150$ なる関係を満足するもの、好ましくは $2.5 \sim 125$ なる関係を満足するもの、より好ましくは $3.0 \sim 100$ なる関係を満足するものとした。

B/A が前記下限値未満の場合、すなわち、図3に示すように、隣接する空孔10a同士の境界部の面積（平均）が空孔の最大断面積（平均）に比較して比較的大

きい基体 10 の場合、骨形成に関与する細胞は、基体 10 の内面に沿って空孔 10 a から隣接する空孔 10 a へ速やかに移動して、基体 10 の外表面 10 b に到達するので、新生骨 2 は、基体 10 の内部および基体 10 の外表面 10 b でほぼ同時、あるいは、基体 10 の外表面 10 b において優先して形成されることになる。

一方、 B/A が前記上限値を超える場合、すなわち、図示しないが、隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）が空孔の最大断面積（平均）に比較して極めて小さい基体の場合、骨形成に関与する細胞は、基体の内部に侵入することが困難となり、新生骨は、基体の外表面で優先して形成されることになる。

これに対し、本発明では、 B/A を前記範囲に設定したことにより、骨形成に関与する細胞は、空孔 1 a を十分に満した後、逸脱（逸流）して、隣接する空孔 1 a へ移動（拡散）するようになるため、図 2 に示すように、基体 1 内部において、多くの新生骨 2 が形成されることになる。このようなことから、本発明の骨形成治療デバイスによれば、基体 1 の形状、すなわち、例えば骨欠損部等の移植部位の形状に対応した骨形成が可能となる。その結果、本発明によれば、早期の骨形成治療に貢献することができる。

具体的に、前記空孔の最大断面積（平均） B は、 $7.9 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 程度であるのが好ましく、 $1.8 \times 10^4 \sim 7.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 程度であるのがより好ましい。なお、この空孔の最大断面積（平均） B を平均空孔径に換算した場合、その値は、 $100 \sim 1200 \mu\text{m}$ （好ましくは $150 \sim 1000 \mu\text{m}$ ）となる。空孔の最大断面積（平均） B を前記範囲とすることにより、基体が骨形成因子等による急速な骨形成を阻害せず、空孔（気孔）内へ骨進入させることが可能になる。

また、基体の空孔率は、特に限定されないが、 $30 \sim 95\%$ 程度であるのが好ましく、 $55 \sim 90\%$ 程度であるのがより好ましい。空孔率を前記範囲とすることにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、基体をより好適な骨形成の場とすることができる。なお、前記空孔率の測定方法としては、SEM（Scanning Electron Microscope）の画像に基づいて測定する方法や細孔分布測定装置による測定などが挙げられる。

また、基体の構成材料としては、第 1 実施形態と同様に、生体適合性を有するも

のであればよく、特に限定されないが、例えば、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト、リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウムのようなリン酸カルシウム系化合物、アルミナ、チタニア、ジルコニア、イットリア等のセラミックス材料、チタンまたはチタン合金、ステンレス鋼、Co-Cr系合金、Ni-Ti系合金等の各種金属材料等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

これらの中でも、基体の構成材料としては、リン酸カルシウム系化合物、アルミナ、ジルコニア等のセラミックス材料（いわゆる、バイオセラミックス）が好ましく、特に、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主材料とするものが好ましい。

ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様（近似）の組成、構造、特性を有するため、特に優れた生体適合性を有している。また、正負両荷電を有しているため、特に、ベクターとしてリポソームを用いる場合には、このリポソームを基体に長時間、安定的に担持させることができる。その結果、リポソームに吸着または封入された組換えプラスミド（核酸）も基体に長時間、安定的に保持されることになり、より迅速な骨形成に寄与する。また、骨芽細胞との親和性も高いことから新生骨を維持する上でも好ましい。

このような基体は、種々の方法により作製（製造）することができる。基体として、セラミックス材料で構成される多孔質ブロック体を作製する場合を一例に説明すると、このような多孔質ブロック体は、例えば、水溶性高分子を含むセラミックススラリーを攪拌起泡後に乾燥させ多孔質ブロックにし、骨欠損部等の移植部位に対応した形状に、例えばマシニングセンター等の汎用加工機械により成形体を得、かかる成形体を焼結（焼成）することによって作製することができる。

このような基体の製造方法において、例えば、原料粉体合成の条件（1次粒子径、1次粒子分散状態等）、原料粉体の条件（平均粒径、仮焼成の有無、粉碎処理の有無等）、攪拌起泡の条件（界面活性剤の種類、スラリーを攪拌する攪拌力等）、焼成条件（焼成雰囲気、焼成温度等）等を適宜設定することにより、前記B/Aの値を所望のものに設定することができる。例えば、焼成温度を高くすると、原料粉体同士の間で拡散が促進され、Aの値が小さくなり、B/Aの値が大きくなる傾向を

示す。

特に、原料粉体の条件、攪拌起泡の条件等は、 B/A の値に大きく影響を与えるため、これらの条件の管理は、より厳密に行うのが好ましい。

なお、目的とする B/A の値を得るための各種条件は、実験的に求めることができる。

以上のような骨形成治療デバイスは、組換えプラスミド（核酸）を基体に接触させることにより作製（製造）することができる。具体的には、骨形成治療デバイスは、例えば、組換えプラスミドを含む液体（溶液または懸濁液）を基体に供給すること、あるいは、この液体に基体を浸漬すること等により、容易に作製することができる。

また、例えば、粉末状、顆粒状、ペレット状等の基体の前駆体とバインダーと前述したような液体とを混練した混練物を、成形することにより骨形成治療デバイスを作製することもできる。

このような骨形成治療デバイスを、例えば骨欠損部等の移植部位に埋設（適用）すると、この骨形成治療デバイスの近傍に存在する骨形成に関与する細胞が、その細胞内に組換えプラスミド（核酸）を取り込む。これらの細胞内では、組換えプラスミドを鋳型として順次BMPが産生され、このBMPにより、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化が誘導され、その結果、骨形成が進行する。なお、この骨形成は、基体の外表面から内部に向かって、基体の形状に対応して（移植部位の形状に対応して）、迅速に進行する。

以下、ベクターおよび血管形成誘導因子について、説明するが、これらの詳細は、前述した第1の実施形態と同じであり、詳細については、前述した内容を参照されたし。

ベクターは、前述した第1の実施形態と同様に、組換えプラスミド（核酸）を保持し、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みを促進する機能を有するものである。ベクターを用いることにより、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みの効率がより向上し、結果として、より迅速な骨形成が促される。ベクターの詳細については、前述したものを参照されたし。

血管形成誘導因子は、血管形成に関与する細胞（例えば、血管皮内細胞等）に作

用して、新生血管の形成を促進するものである。この血管形成誘導因子を用いることにより、基体の内部（空孔内）に、すなわち、骨芽細胞の周囲に新生血管が形成される。これにより、細胞の構築（形成）に必要な各種基質が骨芽細胞に供給されるので、骨芽細胞は、効率よく増殖することができる。その結果、骨形成をより促進することができる。この血管形成誘導因子の詳細についても、第1の実施形態における説明を参照されたし。

以上、本発明の骨形成治療デバイスの第2の好適な実施形態について説明したが、本発明は、第1の実施形態の場合と同様に、これに限定されるものではない。

前記実施形態では、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸として、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだ組換えプラスミドを代表に説明したが、本発明におけるBMPをコードする塩基配列を含む核酸としては、例えば、BMP cDNA（発現プラスミドに組み込まないもの）、BMPのmRNA、あるいは、これらに任意の塩基を付加したもの等であってもよい。

また、骨誘導因子として、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸を代表に説明したが、本発明における骨誘導因子としては、前述したようなBMP自体等が挙げられる。

次に、本発明の第2の実施形態の具体的実施例について説明する。なお、以下の説明では、第1の実施形態では、その実施例および比較例の番号の後に“A”の符号が付されているのに対し、それと区別するために、実施例および比較例の番号の後に“B”の符号を付してある。

（実施例1B）

1. 組換えプラスミドの調製

公知の方法により、ヒトBMP-2 cDNA（ヒトBMP-2をコードする塩基配列）と、所望の塩基配列とを、発現プラスミドに組み込んで、図1に示すような組換えプラスミドを得た。

そして、この組換えプラスミドを、次のようにして増殖させた。

まず、室温で、組換えプラスミドを、DH5 α （Competent Bacteria）の懸濁液200 μ Lに添加した。

次に、この混合液をLB寒天培地に添加して、37 $^{\circ}$ C \times 12時間、培養した。

次に、この培養終了後、LB寒天培地に増殖したコロニーの中から比較的大きいコロニーを選択し、これをAmp（アンピシリン）を含むLB寒天培地に移植し、さらに37℃×12時間、培養した。

その後、Ampを含むLB寒天培地で増殖したDH5 α の細胞膜を破壊し、その溶液から、組換えプラスミドを精製分離した。

2. ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）の製造

公知の湿式合成法によりハイドロキシアパタイトを合成し、ハイドロキシアパタイトスラリーを得た。

このハイドロキシアパタイトスラリーを噴霧乾燥して平均粒径15 μ m程度の粉体を得た。その後、この粉体を700℃×2時間、仮焼成した後、汎用粉碎装置を使用し、平均粒径12 μ m程度に粉碎した。粉碎したハイドロキシアパタイト粉体を、1wt%メチルセルロース（水溶性高分子）水溶液に混合した後、攪拌して、気泡を含有するペースト状混合物を得た。なお、ハイドロキシアパタイト粉体とメチルセルロース水溶液とは、重量比5：6で混合した。

このペースト状混練物を型に入れて、水溶性高分子をゲル化させるため80℃で乾燥し、成形体を製造した。成形体を汎用旋盤等の加工機械を使用し直径10mm×厚さ3mm（体積：約0.24mL）の円盤状に加工した。

この円盤状成形体を1200℃、大気中で2時間焼成し、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体を得た。

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体は、空孔率70%であった。この測定は、アルキメデス法により行った。また、前記B/Aは、約100であり、また前記Bは、約 $2.8 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ であった。

図4には、このハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真を示した。

3. 骨形成治療デバイスの作製

組換えプラスミドを含有するリン酸緩衝液と、血管形成誘導因子である塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含有するリン酸緩衝液と、ベクターである正荷電リポソーム（QIAGEN社製、「Superfect」）を含有するリン酸緩衝液とを用意し、組換えプラスミドが10 μ g、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF

F) $1\mu\text{g}$ 、正荷電リポソームが $40\mu\text{g}$ となるように、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に含浸させた。

これにより、骨形成治療デバイスを得た。

(実施例 2 B)

前記実施例 1 B と同様のハイドロキシアパタイト粉体と、非イオン性界面活性剤である N, N-ジメチルドデシルアミノオキサド (ライオン (株) 製、「AROMOX」) とを、 $1\text{wt}\%$ メチルセルロース (水溶性高分子) 水溶液に混合した後、前記実施例 1 より激しく攪拌して、気泡を含有するペースト状混合物を得た。なお、N, N-ジメチルドデシルアミノオキサドは、ペースト状混合物中に、 $2\text{wt}\%$ となるよう添加した。

かかるペースト状混合物を用いて、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) を製造した以外は、前記実施例 1 B と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) は、 B/A が約 3、かつ、空孔率が 85% であった。また、前記 B は、約 $7.1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ であった。

図 5 には、このハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を 50 倍に拡大した電子顕微鏡写真を示した。

(比較例 1 B)

ペースト状混合物を得る際に、窒素ガスを吹き込みながら攪拌した以外は、前記実施例 2 B と同様にして、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体を得、骨形成治療デバイスを作製した。

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) は、 B/A が約 1、かつ、空孔率が 95% であった。

(比較例 2 B)

前記実施例 1 B と同様のハイドロキシアパタイト粉体を水に懸濁したスラリーを用いて、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) を製造した以外は、前記実施例 1 と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) は、 B/A が約 160、かつ、空孔率が 30% であった。

<評価>

1. 評価実験

24羽の家兎（平均体重3.0kg）を用意した。各家兎には、それぞれ、次のような手術を施した。

まず、家兎に対して、25mg/kg ペントバルビタールナトリウム（アボットラボラトリー社製、「ネンプタール」）を静脈内投与することにより麻酔した。

次に、家兎の頭皮に切開を入れ、尾側を茎とする幅2.5cm×長さ3.0cmの皮弁として挙上した。

次に、露出した骨膜に2～3mmの切開を入れ、かかる部分に骨膜剥離子を当てて、直径約3mmの部分で剥離して頭蓋骨を露出させた。

次に、露出した頭蓋骨の正中付近を、頭蓋骨穿頭器を用いて開頭し、硬膜は温存するように、その直上まで頭蓋骨を除去した後、完全に止血した。なお、頭蓋骨の厚さは約3mmであり、開頭部分の直径は約1.2cmとした。

次に、開頭を行った家兎を6羽ずつの計4群に分け、第1群の各家兎には、それぞれ、実施例1Bの骨形成治療デバイスを、第2群の各家兎には、それぞれ、実施例2Bの骨形成治療デバイスを、第3群の各家兎には、それぞれ、比較例1Bの骨形成治療デバイスを、また、第4群の各家兎には、それぞれ、比較例2Bの骨形成治療デバイスを移植した後、皮弁を元の位置へ戻して縫合した。

そして、手術が行われた各家兎を、それぞれ、個別のケージに入れて飼育した。

2. 評価結果

手術後9週目に全ての家兎を、前記同様の麻酔薬を過量投与することにより屠殺した。

その後、頭蓋骨を直上の皮膚とともに一塊として切除し、採取した組織を直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固定した後、ポリエステル樹脂に埋入した。次に、このポリエステル樹脂に埋入した組織を、厚さ50μmとなるように薄切研磨した後、cole-HE染色を行った。これにより、組織標本を得た。

得られた各組織標本について、それぞれ、次のようにして骨形成率を測定した。すなわち、各組織標本を、それぞれ、デジタルカメラ（DP-12）付き実体顕微鏡システムSZX-12（オリンパス社製）で撮影した。次に、photosho

p__ver 4. 0（アドビ社製）を使用し、撮影した画像データから新生骨部分をデジタル処理により抽出し、さらにSCIONイメージ（Scion社製）を用いて、画像解析の手法により前記抽出された新生骨部分の面積を計測数値化して骨形成率を求めた。

なお、骨形成率の測定は、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の面方向（厚さ方向に垂直な方向）の端部から5mm×（ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の厚さ3mm+硬膜側へ2mmの部分）の範囲について行った。また、骨形成率は、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の内部および外表面のそれぞれについて求めた。

この結果を表2に示す。

表 2

	骨形成治療デバイス		評価結果	
	HA p 多孔質焼結体		骨形成率（％）	
	B/A	空孔率（％）	内部	外表面
実施例 1	1 0 0	7 0	42±10.5	25±13.1
実施例 2	3	8 5	40±10.5	14±12.1
比較例 1	1	9 5	10±10.3	40±10.4
比較例 2	1 6 0	3 0	24±12.4	33±11.8

HA p：ハイドロキシアパタイト

表2に示すように、実施例1 Bおよび実施例2 Bの骨形成治療デバイスでは、いずれも、基体の外表面よりも内部での迅速な骨形成が認められた。

これに対し、比較例1 Bおよび比較例2 Bの骨形成治療デバイスでは、いずれも、基体の内部に比較して外表面での骨形成が有意であった。

このように、基体の内部形状（空孔形態）を好適なものに設定することにより、基体の形状（移植部位の形状）に対応した骨形成が可能となることが明らかとなった。

また、基体として、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に代わり、リン酸三カルシウム多孔質焼結体を用いて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記とほぼ同様の評価結果が得られた。

また、骨誘導因子として、各種ヒトBMP、各種ヒトBMPをコードする塩基配列を含む核酸、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

また、血管形成誘導因子として、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）に代わり、血管内皮増殖因子（VEGF）または肝細胞増殖因子（HGF）、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

以上述べたように、本発明の第2の実施形態によれば、極めて迅速かつ、移植部位の形状に対応した骨形成を可能とし、早期の骨形成治療に貢献することができる。

このため、各種骨形成治療に際し、遊離骨移植を行う必要がなくなり、採骨部が不要となることから、より安全かつ確実で、合理的な手術が可能となる。

このようなことから、手術時間や入院期間の短縮を図ることができ、トータルの医療コストの削減、治療クオリティの向上、患者のQOLの向上を図ることができる。

また、血管形成誘導因子を併用することにより、骨芽細胞の周囲に新生血管が活発に形成され、骨芽細胞が効率よく増殖して、その結果、より迅速な骨形成がなされる。

また、核酸を保持するベクターを併用することにより、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞内への核酸の取り込みの効率が向上して、結果として、より迅速な骨形成がなされる。

また、本発明の骨形成治療デバイスは、保存、取扱いや手術時の加工等が容易である。

最後に、以下のクレームに記載された本発明の範囲や精神から逸脱することなく上述した実施形態や実施例に種々の改良や付加をなすことができることを理解されたい。

また、本件出願の開示は、特願2002-324371（出願日：2002年11月7日）および特願2002-356079（出願日：2002年12月6日）に含まれる主題に関するもので、それらの内容は、それらの出願番号を引用することにより全体として本件出願に組み込まれていることも理解されたい。

請求の範囲

1. 骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列および発現プラスミド由来の塩基配列を含む核酸と、

血管形成誘導因子と、

前記核酸を保持する非ウィルス由来のベクターと、

生体適合性を有する基体と、を含み、

前記血管形成誘導因子と前記核酸とを、重量比で10：1～1：100で配合したこと特徴とする骨形成治療デバイス。

2. 前記基体は、隣接する空孔同士が連通する連続空孔を有する多孔質ブロック体で構成されている請求項1に記載の骨形成治療デバイス。

3. 前記基体の隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）をA [μm^2] とし、前記空孔の最大断面積（平均）をB [μm^2] としたとき、 B/A が2～150なる関係を満足する請求項2に記載の骨形成治療デバイス。

4. 前記空孔の最大断面積（平均）Bは、 $7.9 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ である請求項2または3に記載の骨形成治療デバイス。

5. 前記基体の空孔率は、30～95%である請求項2ないし4のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

6. 前記血管形成誘導因子は、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）のうちの少なくとも1種である請求項1ないし5のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

7. 前記骨形態形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種である請求項1ないし6のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

8. 前記核酸を、前記基体の体積 1 mL あたり 1 ~ 100 μ g となるよう用いる請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

9. 前記非ウイルス由来のベクターは、リポソームである請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

10. 前記リポソームは、正荷電リポソームである請求項 9 に記載の骨形成治療デバイス。

11. 前記非ウイルス由来のベクターと前記核酸との配合比は、重量比で 1 : 1 ~ 20 : 1 である請求項 1 ないし 10 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

12. 前記基体は、ブロック体である請求項 1 に記載の骨形成治療デバイス。

13. 前記基体は、多孔質体である請求項 1 に記載の骨形成治療デバイス。

14. 前記多孔質体の空孔率は、30 ~ 95 % である請求項 13 に記載の骨形成治療デバイス。

15. 前記基体は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主とするものである請求項 1 ないし 14 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

**pCAH.BMP2
(5910 bp)**

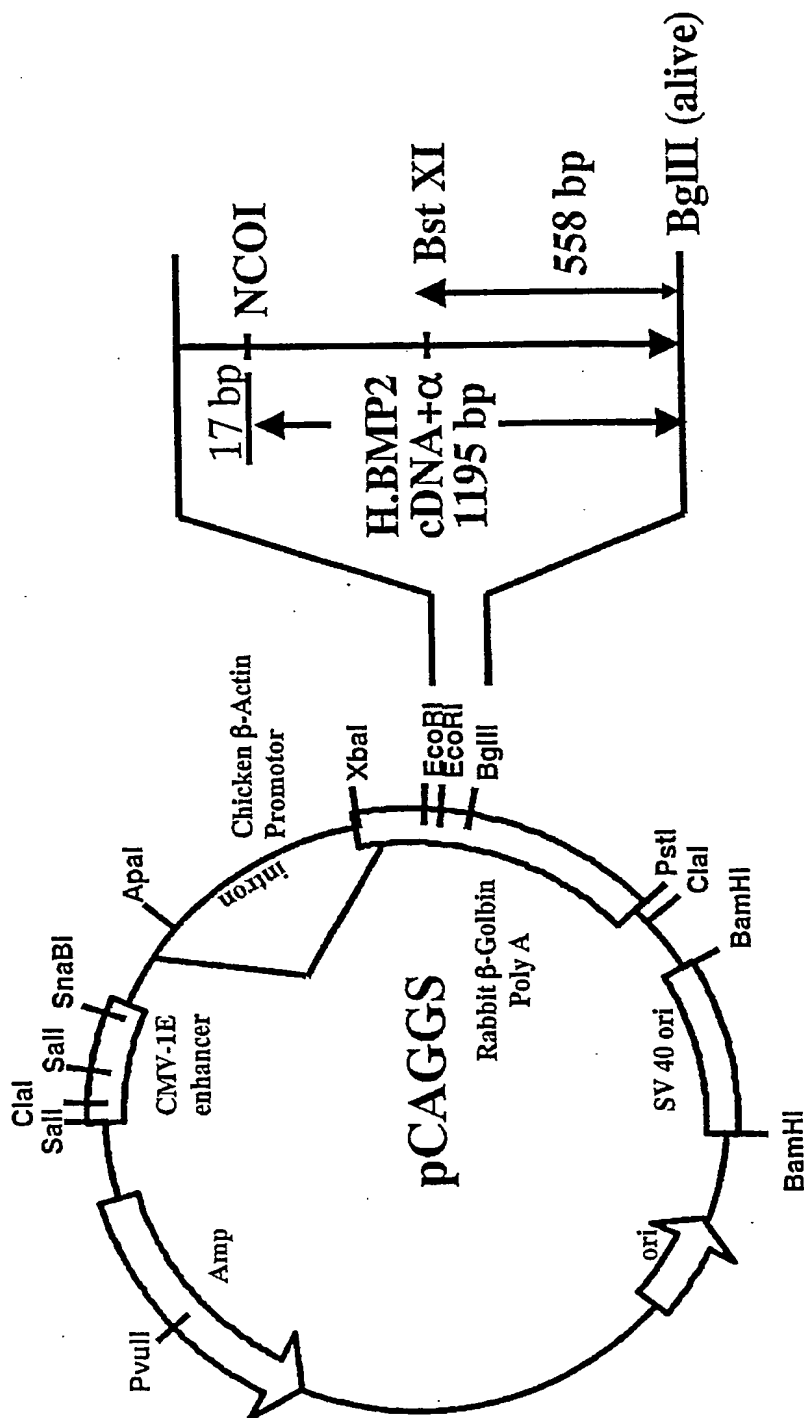


Fig. 1

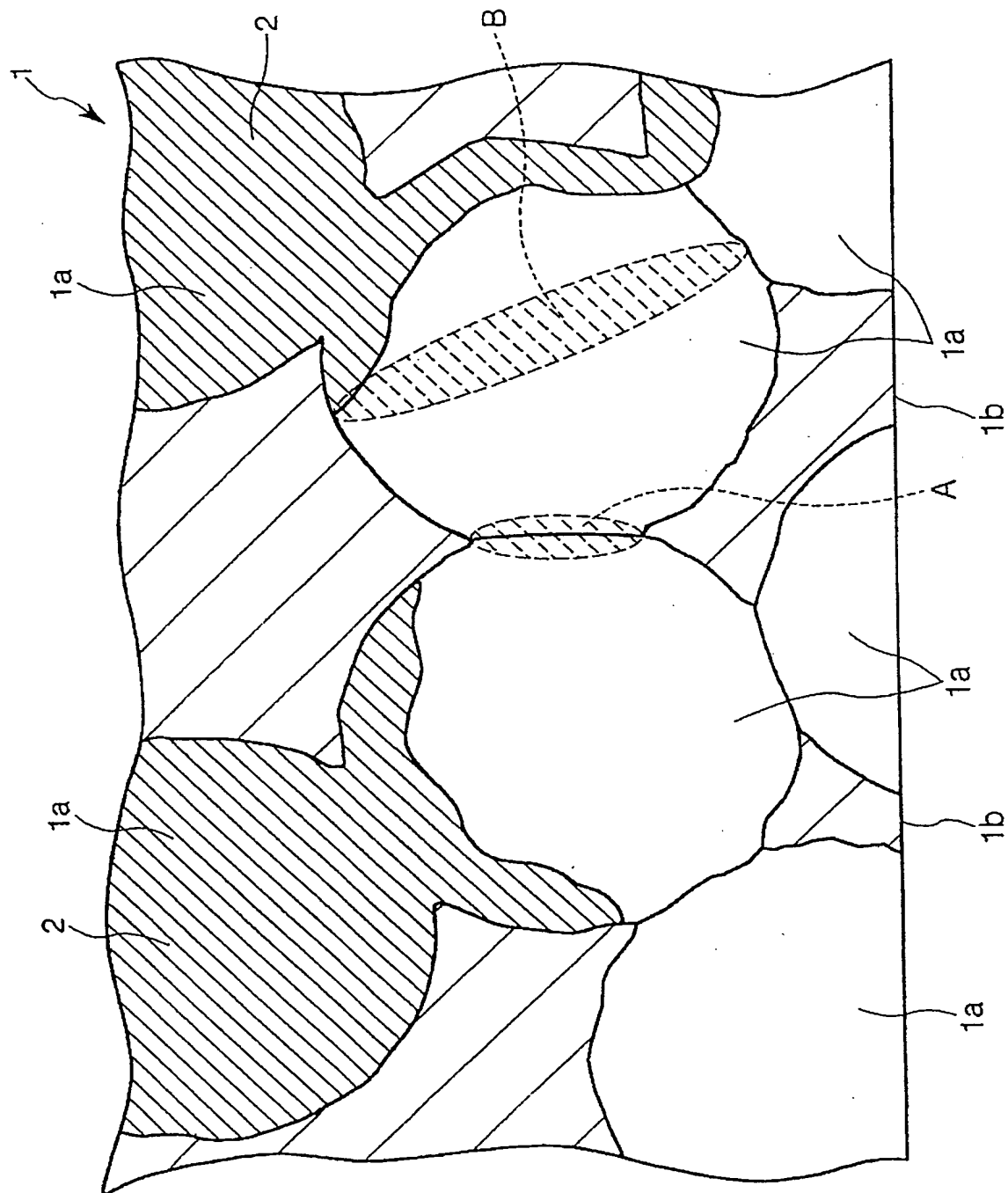


Fig. 2

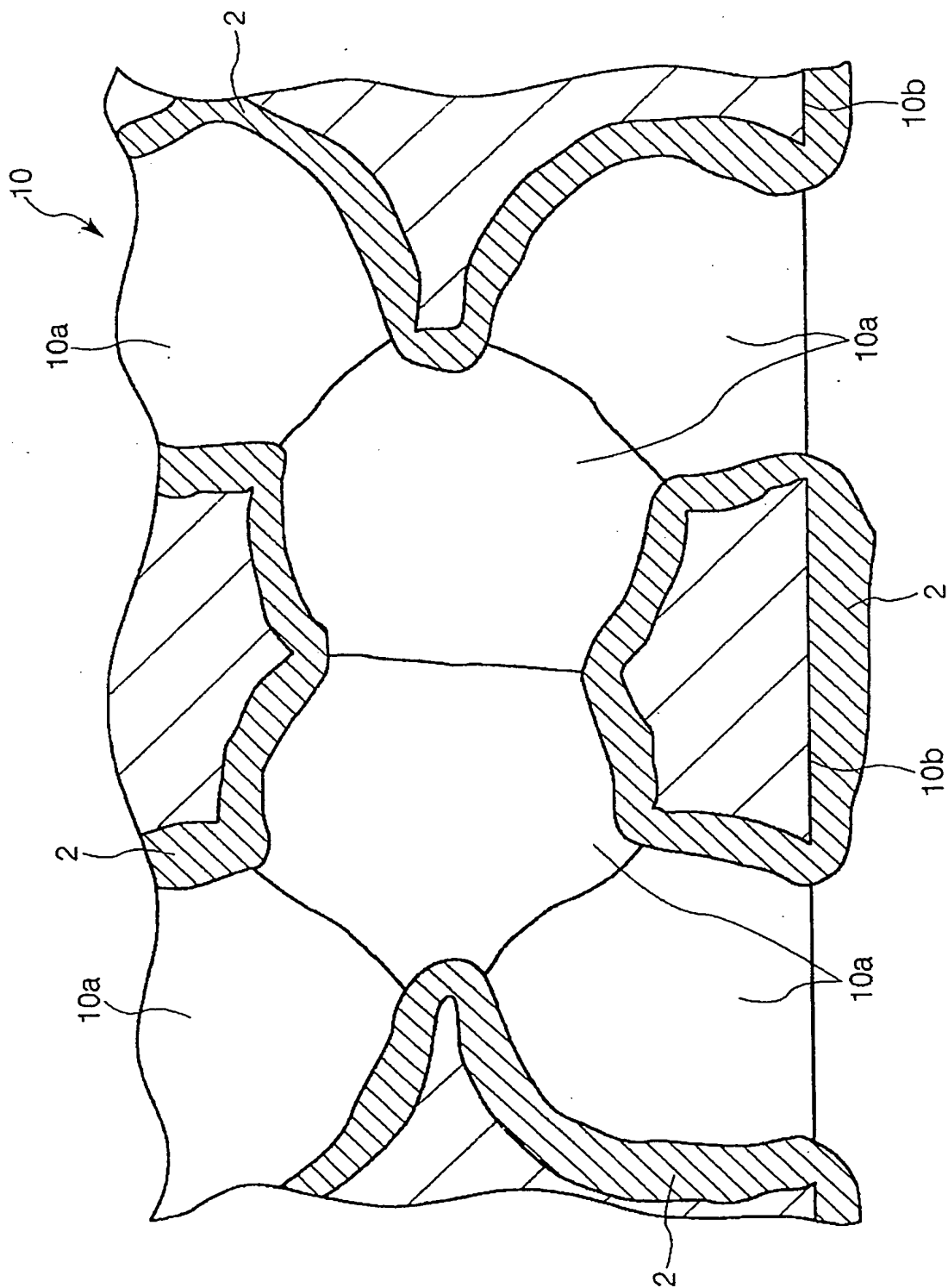


Fig. 3

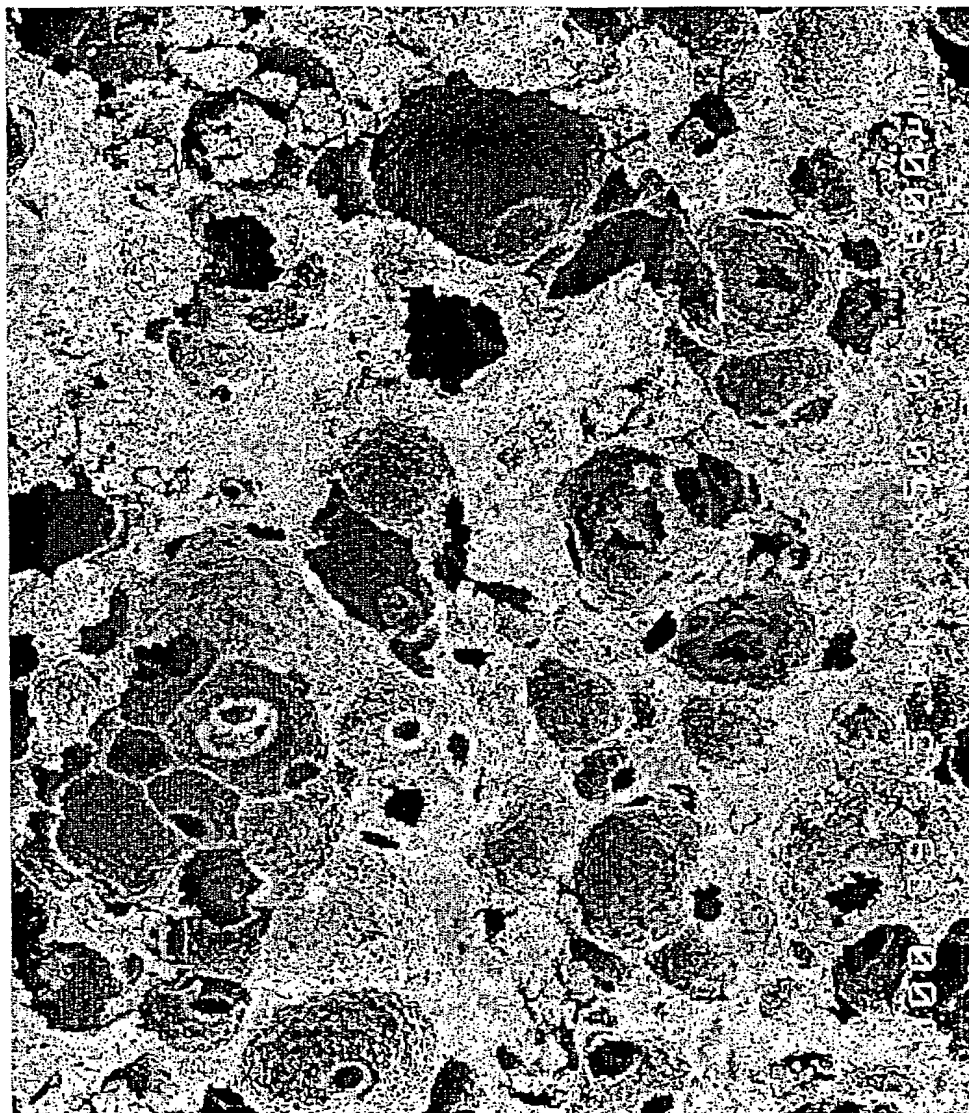


Fig. 4

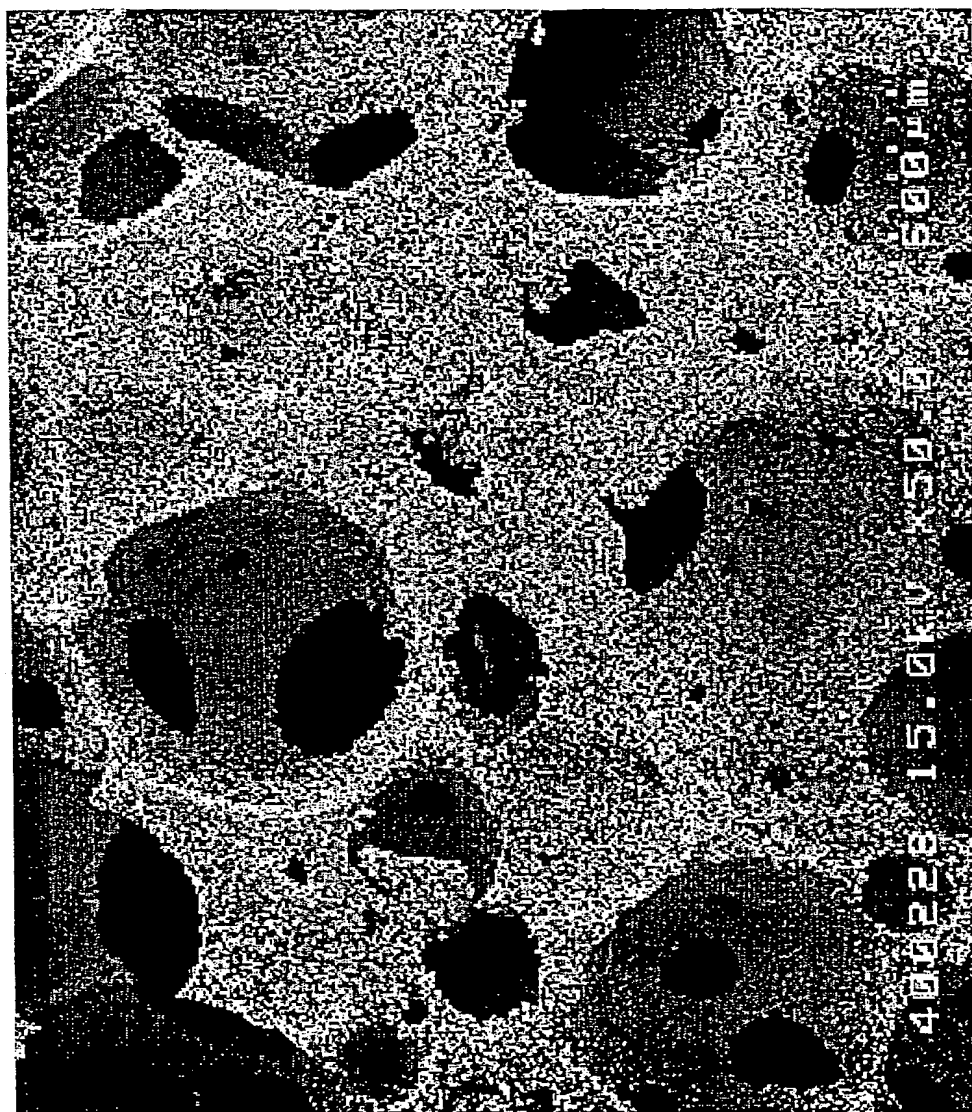


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61L27/42, 27/36, 27/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61L27/42, 27/36, 27/56

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 95/22611 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN), 24 August, 1995 (24.08.95), Claims 29 to 31, 40 to 42, 46 to 48, 77 to 82; page 24, line 29 to page 25, line 6; page 25, lines 25 to 30; page 66, lines 5 to 20; page 69, lines 25 to 27</p> <p>& AT 186327 A & AU 698906 B2 & AU 710386 B2 & AU 1968695 A & AU 2821297 A & CA 2183542 A1 & CA 2251655 A1 & CN 1226835 A & DE 69513149 A & DK 741785 A & EP 0741785 A1 & EP 0892644 A1 & ES 2139889 A & JP 9-509825 A & JP 2001-519767 A & KR 2000005376 A & NO 984729 A & PL 343864 A1 & RU 2170104 C2 & US 5763416 A</p>	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 January, 2004 (09.01.04)

Date of mailing of the international search report
27 January, 2004 (27.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14174

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& US 5942496 A & US 6074840 A & WO 97/38729 A1 & US 5962427 A & US 2002/193338 A1	
Y	WO 93/04710 A2 (SHAW Robert Francis), 18 March, 1993 (18.03.93), Claims 1 to 4, 6; page 25, lines 2 to 14; page 26, lines 27 to 33 & AU 657888 B2 & CA 2116859 A1 & IL 102988 A & NO 940764 A & TW 436300 B & ZA 9206729 A & AU 2541192 A & EP 0530804 A & JP 7-500741 A & NZ 244060 A & US 5270300 A	1-15
Y	US 6340648 B1 (TOSHIBA CERAMICS CO., LTD.), 22 January, 2002 (22.01.02), Claim 1; column 6, lines 63 to 67; examples 1 to 4 & DE 10018394 A1 & JP 2000-302567 A & GB 2348872 A	3-11, 15
Y	US 2002/0022885 A1 (Takahiro OCHI), 21 February, 2002 (21.02.02), Claims 1, 12 to 13 & EP 1155705 A2 & JP 2002-102328 A & JP 2003-019195 A & JP 2002-017846 A & JP 2002-102329 A	3-11, 15
A	WO 98/21972 A2 (BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH.), 28 May, 1998 (28.05.98), & AU 5553398 A & EP 0942758 A2 & DE 19647853 A1 & JP 2001-505097 A	1-15
A	WO 97/38729 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN), 23 October, 1997 (23.10.97), & AT 186327 A & AU 710386 B2 & AU 2821297 A & CA 2251655 A1 & DE 69513149 A & EP 0741785 A1 & ES 2139889 A & JP 2001-519767 A & NO 984729 A & AU 698906 B2 & AU 1968695 A & CA 2183542 A1 & CN 1226835 A & DK 741785 A & EP 0892644 A1 & JP 9-509825 A & KR 2000005376 A & PL 343864 A1	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61L27/42, 27/36, 27/56

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61L27/42, 27/36, 27/56

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 95/22611 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN), 1995. 08. 24, 請求の範囲29-31, 40-42, 46-48, 77-82, 第24頁第29行-第25頁第6行, 第25頁第25-30行, 第66頁第5-20行, 第69頁第25-27行 & AT 186327 A & AU 698906 B2 & AU 710386 B2 & AU 1968695 A & AU 2821297 A & CA 2183542 A1 & CA 2251655 A1 & CN 1226835 A & DE 69513149 A & DK 741785 A & EP 0741785 A1 & EP 0892644 A1 & ES 2139889 A & JP 9-509825 A & JP 2001-519767 A & KR 2000005376 A & NO 984729 A & PL 343864 A1 & RU 2170104 C2 & US 5763416 A & US 5942496 A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 01. 2004

国際調査報告の発送日

27. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

柿原 貴子

印

4 C

9 4 4 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& US 5962427 A & US 6074840 A & US 2002/193338 A1 & WO 97/38729 A1	
Y	WO 93/04710 A2 (SHAW Robert Francis), 1993. 03. 18, 請求の範囲1-4, 6, 第25頁第2-14行, 第26頁第27-33行 & AU 657888 B2 & AU 2541192 A & CA 2116859 A1 & EP 0530804 A & IL 102988 A & JP 7-500741 A & NO 940764 A & NZ 244060 A & TW 436300 B & US 5270300 A & ZA 9206729 A	1-15
Y	US 6340648 B1 (TOSHIBA CERAMICS CO., LTD.), 2002. 01. 22, 請求の範囲1, 第6欄第63-67行, EXAMPLE 1-4 & DE 10018394 A1 & GB 2348872 A & JP 2000-302567 A	3-11, 15
Y	US 2002/0022885 A1 (Takahiro OCHI), 2002. 02. 21, 請求の範囲1, 12-13 & EP 1155705 A2 & JP 2002-017846 A & JP 2002-102328 A & JP 2002-102329 A & JP 2003-019195 A	3-11, 15
A	WO 98/21972 A2 (BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHE- N ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH), 1998. 05. 28 & AU 5553398 A & DE 19647853 A1 & EP 0942758 A2 & JP 2001-505097 A	1-15
A	WO 97/38729 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 1997. 10. 23 & AT 186327 A & AU 698906 B2 & AU 710386 B2 & AU 1968695 A & AU 2821297 A & CA 2183542 A1 & CA 2251655 A1 & CN 1226835 A & DE 69513149 A & DK 741785 A & EP 0741785 A1 & EP 0892644 A1 & ES 2139889 A & JP 9-509825 A & JP 2001-519767 A & KR 2000005376 A & NO 984729 A & PL 343864 A1	1-15

特許協力条約に基づき国際出願
願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	受理 記入欄
国際出願日	
(受付印)	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字) PTX-31-PCT	

第I欄 発明の名称
骨形成治療デバイス

第II欄 出願人 ☐ この欄に記載した者は、発明者でもある。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

ペンタックス株式会社
PENTAX Corporation
〒174-8639 日本国東京都板橋区前野町2丁目36番9号
36-9, Maeno-cho 2-chome, Itabashi-ku, Tokyo 174-8639 JAPAN

電話番号:

03-3960-5162

ファクシミリ番号:

03-5392-2012

加入電話番号:

出願人登録番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

小野 一郎
ONO Ichiro
〒005-0013 日本国北海道札幌市南区真駒内緑町3丁目4-2-406
4-2-406, Makomanai midorimachi 3-chome, Minami-ku, Sapporo-shi,
Hokkaido 005-0013 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

出願人登録番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☒ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

9162 弁理士 朝比 一夫 ASAHI Kazuo
9129 弁理士 増田 達哉 MASUDA Tatsuya
〒105-0003 日本国東京都港区西新橋1丁目18番9号
西新橋ノアビル4階
Nishi-Shinbashi Noa Bldg. 4th Floor
18-9, Nishi-Shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-0003 JAPAN

電話番号:

03-3595-3251

ファクシミリ番号:

03-3595-3253

加入電話番号:

代理人登録番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

中須 正議

NAKASU Masanori

〒174-8639 日本国東京都板橋区前野町2丁目36番9号

ペンタックス株式会社内

c/o PENTAX Corporation,

36-9, Maeno-cho 2-chome, Itabashi-ku, Tokyo 174-8639 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

出願人登録番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

松本 智勇

MATSUMOTO Toshio

〒174-8639 日本国東京都板橋区前野町2丁目36番9号

ペンタックス株式会社内

c/o PENTAX Corporation,

36-9, Maeno-cho 2-chome, Itabashi-ku, Tokyo 174-8639 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

出願人登録番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は
次に該当する:☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

出願人登録番号:

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は
次に該当する:☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

出願人登録番号:

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第V欄 国の指定

(該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う。ほかの種類の保護又は取扱をいずれかの指定国（又はOAPI）で求める場合には追記欄に記載する。

広域特許

- ☒ **AP ARIPO** 特許：GHガーナ Ghana, GMガンビア Gambia, KEケニア Kenya, LSレソト Lesotho, MWマラウイ Malawi, MZモザンビーク Mozambique, SDスーダン Sudan, SLシエラレオネ Sierra Leone, SZスワジランド Swaziland, TZタンザニア United Republic of Tanzania, UGウガンダ Uganda, ZMザンビア Zambia, ZWジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する）
- ☒ **EA** ユーラシア 特許：AMアルメニア Armenia, AZアゼルバイジャン Azerbaijan, BYベラルーシ Belarus, KGキルギスタン Kyrgyzstan, KZカザフスタン Kazakhstan, MDモルドバ Republic of Moldova, RUロシア Russian Federation, TJタジキスタン Tajikistan, TMトルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EP** ヨーロッパ 特許：ATオーストリア Austria, BEベルギー Belgium, BGブルガリア Bulgaria, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CYキプロス Cyprus, CZチェコ Czech Republic, DEドイツ Germany, DKデンマーク Denmark, EEエストニア Estonia, ESスペイン Spain, FIフィンランド Finland, FRフランス France, GB英国 United Kingdom, GRギリシャ Greece, HUハンガリー Hungary, IEアイルランド Ireland, ITイタリア Italy, LUルクセンブルク Luxembourg, MCモナコ Monaco, NLオランダ Netherlands, PTポルトガル Portugal, ROルーマニア Romania, SEスウェーデン Sweden, SIスロベニア Slovenia, SKスロバキア Slovakia, TRトルコ Turkey, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **OA OAPI** 特許：BFブルキナファソ Burkina Faso, BJベナン Benin, CF中央アフリカ Central African Republic, CGコンゴ共和国 Congo, CIコートジボワール Côte d'Ivoire, CMカメルーン Cameroon, GAガボン Gabon, GNギニア Guinea, GQ赤道ギニア Equatorial Guinea, GWギニア・ビサウ Guinea-Bissau, MLマリ Mali, MRモーリタニア Mauritania, NEニジェール Niger, SNセネガル Senegal, TDチャド Chad, TGトーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国であり特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する）

国内特許（他の種類の保護又は取り扱いを求める場合には点線上に記載する）

- | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦
United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> OM オマーン Oman |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG アンティグア・バーブダ
Antigua and Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> PG パプアニューギニア Papua New Guinea |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> PH フィリピン Philippines |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴビナ Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> SC セーシェル Seychelles |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input checked="" type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギスタン Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> KP 北朝鮮
Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロバキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ ベリーズ Belize | <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラレオネ Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> SY シリア・アラブ Syrian Arab Republic |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン
Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> LC セントルシア Saint Lucia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> LK スリランカ Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CO コロンビア Colombia | <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | <input checked="" type="checkbox"/> TN テュニジア Tunisia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR コスタリカ Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ
Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェコ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> LU ルクセンブルク Luxembourg | <input checked="" type="checkbox"/> TZ タンザニア
United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトビア Latvia | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> MA モロッコ Morocco | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM ドミニカ Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドバ Republic of Moldova | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ アルジェリア Algeria | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EC エクアドル Ecuador | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラビア
共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia | <input checked="" type="checkbox"/> VC セントビンセント及びグレナ
ディーン諸島 Saint Vincent and the Grenadines |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia | <input checked="" type="checkbox"/> VN ベトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi | <input checked="" type="checkbox"/> YU セルビア・モンテネグロ Serbia and Montenegro |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> MZ モザンビーク Mozambique | <input checked="" type="checkbox"/> ZM ザンビア Zambia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> NI ニカラグア Nicaragua | <input checked="" type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノルウェー Norway | |
| | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュージーランド New Zealand | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定するためのものである。

□ □ □

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。但し、追記欄にこの宣言から除外旨の表示をした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

第VI欄 優先権主張

以下の先の出願に基づく優先権を主張する：

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：パリ条約同盟国名又は WTO 加盟国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 07.11.02	特願2002-3243 71	日本国 JAPAN		
(2) 06.12.02	特願2002-3560 79	日本国 JAPAN		
(3)				
(4)				
(5)				

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている。

上記の先の出願（ただし、本国際出願の受理官庁に対して出願されたものに限る）のうち、以下のものについて、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求する

☒ すべて ☐ 優先権(1) ☐ 優先権(2) ☐ 優先権(3) ☐ 優先権(4) ☐ 優先権(5) ☐ その他は追記欄参照

*先の出願がARIPO出願である場合には、当該先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国若しくは世界貿易機関の加盟国の少なくとも1ヶ国を表示しなければならない（規則 4.10(b)(ii)）：

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択（2以上の国際調査機関が国際調査を実施することが可能な場合、いずれかを選択し二文字コードを記載。）

ISA / JP

先の調査結果の利用請求；当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁名）

第VIII欄 申立て

この出願は以下の申立てを含む。（下記の該当する欄をチェックし、右にそれぞれの申立て数を記載）

申立て数

- ☐ 第VIII欄(i) 発明者の特定に関する申立て : _____
- ☐ 第VIII欄(ii) 出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て : _____
- ☐ 第VIII欄(iii) 先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て : _____
- ☐ 第VIII欄(iv) 発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合） : _____
- ☐ 第VIII欄(v) 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て : _____

第IX欄 照合欄：出願の言語

この国際出願は次のものを含む。

(a) 紙形式での枚数

願書(申立てを含む).....	5	枚
明細書(配列表または配列表 に関連する表を除く)...	29	枚
請求の範囲.....	2	枚
要約書.....	1	枚
図面.....	5	枚
小計	42	枚
配列表.....		枚
配列表に関連する表.....		枚
(いずれも、紙形式での出願の場合はその枚数 コンピュータ読み取り可能な形式の有無を問わない。 下記(C)参照)		
合計	42	枚

(b) ☐ コンピュータ読み取り可能な形式のみの
(実施細則第 801 号(a)(i))

- (i) ☐ 配列表
(ii) ☐ 配列表に関連する表

(c) ☐ コンピュータ読み取り可能な形式と同一の
(実施細則第 801 号(a)(ii))

- (i) ☐ 配列表
(ii) ☐ 配列表に関連する表

媒体の種類 (フロッピーディスク、CD-ROM、CD-R、その他)
と枚数

- ☐ 配列表.....
☐ 配列表に関連する表.....
(追加的写しは右欄 9. (ii) または 10(ii) に記載)

この国際出願には、以下にチェックしたものが添付されている。

- | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 数 | 1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | | 1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面 | | 1 |
| 2. <input type="checkbox"/> 個別の委任状の原本 | | |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の原本 | | |
| 4. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し (あれば包括委任状番号) | | |
| 5. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の欠落についての説明書 | | |
| 6. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第 欄の () の番号を記載する) : | | |
| 7. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する) : | | |
| 8. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 | | |
| 9. <input type="checkbox"/> コンピュータ読み取り可能な配列表
(媒体の種類と枚数も表示する) | | |
| (i) <input type="checkbox"/> 規則 13 の 3 に基づき提出する国際調査のための写し
(国際出願の一部を構成しない) | | |
| (ii) <input type="checkbox"/> (左欄(b)(i)又は(c)(i)にレ印を付した場合のみ)
規則 13 の 3 に基づき提出する国際調査のための写しを含む追加的写し | | |
| (iii) <input type="checkbox"/> 国際調査のための写しの同一性、又は左欄に記載した配列表を含む写しの同
一性についての陳述書を添付 | | |
| 10. <input type="checkbox"/> コンピュータ読み取り可能な配列表に関連する表
(媒体の種類と枚数も表示する) | | |
| (i) <input type="checkbox"/> 実施細則第 802 号の 4 に基づき提出する国際調査のための写し
(国際出願の一部を構成しない) | | |
| (ii) <input type="checkbox"/> (左欄(b)(ii)又は(c)(ii)にレ印を付した場合のみ)
実施細則第 802 号の 4 に基づき提出する国際調査のための写しを含む追加的写し | | |
| (iii) <input type="checkbox"/> 国際調査のための写しの同一性、又は左欄に記載した、配列表に関連した表
を含む写しの同一性についての陳述書を添付 | | |
| 11. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載) : | | |

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の言語：日本語

第X欄 出願人、代理人又は共通の代表者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

朝比 一夫



増田 達哉



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補完する書面又は図面であって
その後期間内に受理されたものの実際の受理の日 (訂正日)

4. 特許協力条約第 11 条 (2) に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA/

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない。

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日：